

УДК 576.895.132 : 599.312.4

ЛЕТУЧИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ АСКАРИД  
И ИХ ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА  
БЕЛЫХ КРЫС СО СЛЮНОЙ И ДРУГИМИ ПУТЬМИ

Х. Х. Алиева, А. А. Лурье, Ф. Ф. Сопрунов

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины  
им. Е. И. Марциновского Министерства здравоохранения СССР, Москва

После введения белым крысам меченых по  $^{14}\text{C}$  летучих жирных кислот, полученных из аскарид, радиоактивные продукты обнаружены в слюне, кале и моче подопытных животных.

Летучие жирные кислоты (ЛЖК) являются конечными продуктами углеводного обмена аскарид (Weinland, 1901; Brand, 1934; Bueding, 1949). Среди этих кислот преобладают 1-метилмасляная, 2-метилмасляная, 1-метилвалериановая, метилкапроновая и другие изомеры  $\text{C}_5$ - и  $\text{C}_6$ -карбоновых кислот с разветвленным углеродным скелетом (Moyle, Baldwin, 1952; Bueding, 1953; Greichus, Greichus, 1966). Наличие в моче больных некоторых из этих кислот используется для биохимической диагностики аскаридоза (Сопрунова, 1968; Сопрунова, Лурье, 1972). Возможности выделения специфических метаболитов аскарид из организма хозяина другими путями (помимо мочи), которые могут представить диагностический интерес, остаются еще не изученными.

В настоящей статье представлены экспериментальные данные о появлении радиоактивных продуктов в слюне, моче и кале белых крыс после введения им  $^{14}\text{C}$ -ЛЖК из аскарид.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Аскарид, *Ascaris suum*, собирали на бойне и доставляли в лабораторию в термосе с теплым физиологическим раствором. С момента сбора паразитов до доставки проходило не более 3 ч. 13 самок аскарид (общей массой 41.2 г), промытых в подогретой дистиллированной воде, поместили в стеклянный сосуд, содержащий 400 мл стерильной среды следующего состава (в %):  $\text{NaCl}$  — 0.8,  $\text{KCl}$  — 0.02,  $\text{CaCl}_2$  — 0.02,  $\text{MgCl}_2$  — 0.01,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 0.1, глюкоза-1 —  $^{14}\text{C}$  с удельной активностью 4.3 мКи/г — 0.025. В этой среде в аэробных условиях и при температуре 37° С аскарид выдержали в течение 26 ч. Путем периодического давления раствора щелочи рН среды поддерживали на уровне 8—10 (окислительно-восстановительный потенциал 150—250 мВ), что должно было привести к повышению потребления глюкозы и выделению органических кислот (Сопрунов и др., 1964).

ЛЖК из среды содержания гельминтов отгоняли с водяным паром в 0.1 М раствор  $\text{NaOH}$  в присутствии фенолфталеина. Затем путем выпаривания на водяной бане получали сухие натриевые соли ЛЖК. Состав кислот определили методом бумажной хроматографии в виде гидроксаматов (Пушкирев, 1965). Наличие радиоактивных ЛЖК на бумажной хроматограмме подтвердили радиоавтографированием на рентгеновской пленке, а соотношение радиоактивности различных кислот определили путем сканиро-

вания радиохроматограммы на автоматическом радиометре NP-227 (Gamma, ВНР) с торцовыми коллимированным счетчиком и лентопротяжным механизмом. Суммарное молярное содержание кислот определяли экстрагированием их из водного раствора солей подкисленным диэтиловым эфиром (Whitehead e. a., 1976) и последующим титрованием 0.01 М раствором NaOH в присутствии фенолфталеина.

Меченные соли ЛЖК в количестве 215 мкмоль, растворенные в 1 мл фосфатного буферного раствора, pH 7.5, вводили внутрибрюшинно трем белым крысам массой около 100 г. Подопытных животных помещали в функциональные клетки. Кал и мочу от животных собирали раздельно через 6, 12, 24, 36 и 48 ч после введения. Пробы кала и мочи озолили обработкой 57%-ной HClO<sub>4</sub> и 30%-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с нагреванием до 70—80° С (Mahin, Lofberg, 1966) и анализировали жидкостно-сцинтилляционным методом на радиоспектрометре «Mark II» («Searle Analytic Inc.», США). Использовали сцинтилляционную смесь следующего состава: толуол — 500, диоксан — 500, метилцеллозолль — 300 мл, нафталин — 130, РРО — 7.8 г (все реактивы квалификации «сцинтилляционный» или «ОСЧ»). Коррекцию гашения выполняли по методу внешнего стандарта.

Слюну от животных через 2, 4, 6, 12, 24 и 30 ч после введения ЛЖК собирали на ватные тампоны, предварительно импрегнированные 1%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (для предупреждения возможной потери ЛЖК путем улетучивания). Массу слюны определяли взвешиванием в полиэтиленовых пакетиках. Затем тампоны высушивали и радиометрировали в сцинтилляционной смеси ЖС-1 (4 г/л *n*-терфенила и 0.1 г/л РОРО в толуоле). В ранних экспериментах со слюной мы применяли указанную выше смесь на основе толуола, диоксана и целлозольва. Однако выяснилось, что такая смесь не пригодна для радиометрирования слюны, так как показывала устойчивое слабое свечение сцинтиллятора независимо от наличия <sup>14</sup>C. Связано это, по-видимому, с присутствием перекисных соединений в диоксане и целлозольве и каких-то компонентов слюны, способных реагировать с этими перекисями. Такие реакции нередко сопровождаются эмиссией фотонов. При использовании смесей на основе толуола (ЖС-1) или дитолилметана (ЖС-20Б) хемилюминесценция в присутствии слюны не проявлялась.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

После 26-часового выдерживания 13 аскарид в аэробных условиях в среде с начальным содержанием глюкозы 0.025% было выделено ЛЖК в количестве 5.2 мкмоль, т. е. 4.9 мкмоль/г ткани·ч. На бумажной хроматограмме пятна гидроксаматов, соответствующие кислотам C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub> и C<sub>6</sub>,

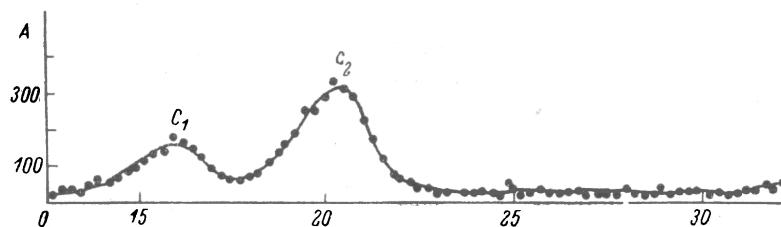


Рис. 1. Радиохроматограмма гидроксаматов ЛЖК, полученных из аскарид.  
A — радиоактивность, имп/мин; X — расстояние от старта, см.

по интенсивности различались мало, но по радиоактивности (на радиоавтографах и при сканировании) пятна кислот C<sub>5</sub> и C<sub>6</sub> были заметно слабее (рис. 1). Статистическая обработка данных сканирования показала, что приблизительно 95% радиоактивности полученных <sup>14</sup>C-ЛЖК приходится на кислоты C<sub>1</sub> и C<sub>2</sub> и приблизительно 5% — на кислоты от C<sub>3</sub> до C<sub>6</sub>.

Наибольшая концентрация <sup>14</sup>C в моче во всех трех экспериментах обнаруживалась в первой порции, полученной через 6—12(24) ч после

введения ЛЖК (рис. 2). Хотя объем выделенной мочи сильно колебался у разных животных, общее количество радиоактивных продуктов, выделяемых с мочой и калом, в течение 48 ч было одинаковым.

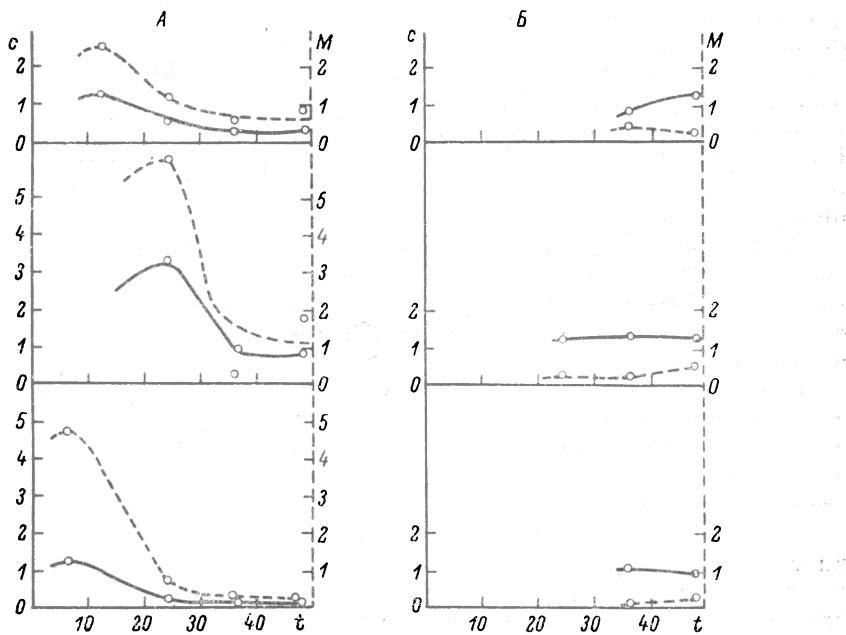


Рис. 2. Динамика выделения у белых крыс меченых ЛЖК (или их метаболитов) с мочой (A) и калом (Б) по данным трех опытов.

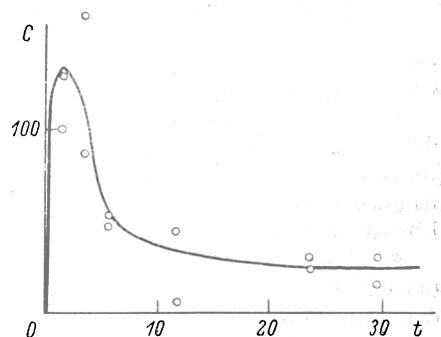
$C$  — концентрация, мкмоль/г;  $M$  — количество, мкмоль;  $t$  — время после введения ЛЖК, ч.

ленных с мочой в течение 2 сут, оказалось очень близким —  $3.2 \pm 0.3\%$  от введенного количества  $^{14}\text{C}$ . Содержание радиоактивных продуктов в кале на вторые сутки после введения  $^{14}\text{C}$ -ЛЖК составляло в среднем около 1 мкмоль/г; всего за 48 ч с калом выделилось  $0.3 \pm 0.2\%$  от введенного  $^{14}\text{C}$ .

Анализ проб слюны на наличие  $^{14}\text{C}$  (рис. 3) показал, что наибольшая

Рис. 3. Динамика содержания радиоактивных продуктов в слюне крыс.

$C$  — концентрация, нмоль/мл;  $t$  — время после введения  $^{14}\text{C}$ -ЛЖК, ч.



концентрация радиоактивных продуктов обнаруживается в первых пробах, через 2 ч — до 100—160 нмоль/мл; к 6 ч эта концентрация снижается до 40—50, а к 30 ч — до 20—30 нмоль/мл.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

При аэробном содержании аскарид в углеводно-солевой среде выход ЛЖК, по литературным данным, составляет от  $\sim 2$  ммоль на 100 г ткани за 24 ч, или 0.8 мкмоль/г ткани·ч (Epps e. a., 1950; Пушкирев, 1965), до 4 ммоль на 100 г ткани за 24 ч, или 1.7 мкмоль/г ткани·ч (Bueding, Yale, 1951), что соответственно в 6 и 3 раза меньше, чем получено в нашем эксперименте. Возможно, это связано со снижением pH и окислительно-восстановительного потенциала среды в эксперименте указанных авторов за счет того, что в среду содержания аскарид в процессе инкубирования не добавлялась щелочь.

Известно, что в аэробных условиях в составе ЛЖК, выделяемых аскаридами, наблюдается сдвиг в сторону кислот с короткой цепочкой (Epps e. a., 1950; Bueding, Yale, 1951; Bueding, 1953; Пушкарев, 1965). Последовательность выделения кислот с короткой цепочкой и их происхождение (экзо- или эндогенного характера), однако, не изучались. Наши данные показывают, что большая часть экскретированных C<sub>5</sub>- и C<sub>6</sub>-кислот произошла еще до включения экзогенной меченой глюкозы в обмен аскарид. Первыми из меченой глюкозы образовывались муравьиная и уксусная кислоты. Впрочем, возможно, что на состав ЛЖК повлияла также низкая концентрация глюкозы в среде (в нашем эксперименте концентрация была намного ниже, чем применяется обычно — 0.5%).

Отмеченные нами явления повышения концентрации ЛЖК в моче при снижении объема выделяемой мочи можно использовать в практике диагностики аскаридоза по Сопруновой (1968). Чувствительность анализа ЛЖК в моче можно увеличить, если ограничить прием воды пациентом за 6—12 ч до сдачи анализа.

Содержание радиоактивных продуктов в кале не зависело от его массы, а общее количество выводимых с калом меченых продуктов возрастало с увеличением массы выделяемого кала. Это подтверждает, что выведение с калом ЛЖК не является основным путем выведения их из организма теплокровного животного.

Обнаружение ЛЖК (или продуктов их превращения) в слюне представляет определенный интерес. Необходимо дальнейшее изучение этого явления с целью возможной разработки диагностического метода обнаружения метаболитов аскарид в слюне хозяина.

#### ВЫВОДЫ

1. В аэробных условиях в углеводно-солевой среде, содержащей глюкозу в концентрации 0.025%, *Ascaris suum* выделяют муравьиную и уксусную кислоты, изомеры C<sub>5</sub>- и C<sub>6</sub>-кислот и следы пропионовой и масляной кислот. В первые 26 ч радиометка из глюкозы-<sup>14</sup>C появляется в основном в муравьиной и уксусной кислотах.

2. После введения белым крысам меченых ЛЖК, выделенных из среды содержания аскарид, радиоактивные продукты обнаружены в слюне, моче и кале животных.

3. С мочой крыс в течение 48 ч выделяется 3.2±0.3% от введенной дозы ЛЖК (2.15 ммоль/кг). Максимум выделения приходится на первые сутки (около 50 мкмоль/кг) и не зависит от количества мочи. Концентрация выделяемых продуктов зависит от количества мочи, колебляясь в пределах 0.3—3 мМ в течение первых 24 ч.

4. С калом крыс в течение 48 ч выделяется 0.3±0.2% от введенной дозы ЛЖК. Концентрация выделяемых соединений постоянна в течение этого времени и составляет 1—2 мкмоль/г.

5. Концентрация радиоактивных продуктов в слюне максимальна в первые часы после введения животным <sup>14</sup>C-ЛЖК и составляет 100—160 мкМ. К 30 ч после введения концентрация падает до 20 мкМ.

6. Быстрое выделение конечных продуктов обмена аскарид со слюной позвоночного хозяина позволяет поставить вопрос о разработке нового биохимического диагностического теста на аскаридоз.

#### Л и т е р а т у р а

Пушкарев И. А. 1965. Жирные кислоты *Ascaris suum* (состав, выделение в среду, влияние условий содержания аскарид и тормозящее действие антигельминтиков). Автореф. канд. дис. Рига : 54—63.  
Сопрунов Ф. Ф., Бенедиктов И. И., Салменкова Е. А., Григорович Ю. А. 1964. Особенности биохимического обмена аскариды свиньи (*Ascaris suum* Goeze 1872). — В кн.: Проблемы медицинской паразитологии и профилактики инфекций. М. : 472—494.  
Сопрунова Н. Я. 1968. Биохимическая диагностика аскаридоза. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 37 (1) : 76—78.

Сопрунова Н. Я., Лурье А. А. 1972. Определение с помощью газовой хроматографии летучих жирных кислот, выделяемых гельминтами, в моче больных гельмитозами. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 41 (2) : 137—141.

Brand T., von. 1934. Der Stoffwechsel von Ascaris lumbricoides bei Oxybiose und Anoxybiose. — Z. vergl. Physiol., 21 (6) : 220—235.

Bueding E. 1949. Metabolism of parasitic helminth. — Physiol. Rev., 29 (3) : 195—218.

Bueding E. 1953. Formation of tiglic and n-valeric acids by bacteria-free Ascaris lumbricoides. — J. Biol. Chem., 202 (2) : 505—512.

Bueding E., Yale H. W. 1951. Production of  $\alpha$ -methylbutiric acid by bacteria-free Ascaris lumbricoides. — Ibid., 193 (1) : 411—423.

Epps W., Weiner M., Bueding E. 1950. Production of steam volatile acids by bacteria-free Ascaris lumbricoides. — J. Infect. Dis., 87 (2) : 149—151.

Greichus A., Greichus Y. A. 1966. Chemical composition and volatile fatty acids of male Ascaris lumbricoides before and after starvation. — Exp. parasitol., 19 (1) : 85—90.

Mahin D. T., Lofberg R. T. 1966. A simplified method preparation of tritium, carbon-14, or sulfur-35 in blood or tissue by liquid scintillation counting. — Anal. Biochem., 16 (3) : 500—539.

Moyle V., Baldwin E. 1952. Volatile fatty acids of Ascaris lumbricoides from the pig. — Biochem. J., 51 (4) : 504—510.

Weinland E. O. 1901. Über Kohlenhydratzersetzung ohne Sauerstoffaufnahme bei Ascaris, einen tierischen Gärungsprozess. — Z. Biol., 42 (1) : 55—90.

Whitehead J. S., Kim Y. S., Prizant R. 1976. A simple quantitative method to determine short chain fatty acid levels in biological fluids. — Clin. Chim. Acta, 72 (3) : 315—318.

---

#### VOLATILE FATTY ACIDS OF ASCARIDAE AND THEIR EXCRETION FROM WHITE RATS WITH SALIVA AND IN OTHER WAYS

Kh. Kh. Alieva, A. A. Lurje, F. F. Soprunov

#### S U M M A R Y

By maintaining Ascarids in a medium containing glucose-1-6- $^{14}\text{C}$  volatile fatty acids labelled with  $^{14}\text{C}$  were obtained. These acids were administered peritoneally to white rats. The excretion of radioactive products with urine, excrements and saliva was studied.

---